

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR**  
**ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE MENTOURI-CONSTANTINE**  
**FACULTE DES SCIENCES EXACTES**  
**DEPARTEMENT DE CHIMIE**  
Laboratoire pollution et traitement des eaux

## **MEMOIRE**

*PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE :*

**MAGISTER en CHIMIE**

**BIODEGRADATION DU MEK EN REACTEUR BATCH :  
INFLUENCE DE LA PRESENCE D'ACETONE ET DES CONDITIONS DE  
CULTURE INITIALES**

**Option : CHIMIE ANALYTIQUE ET PHYSIQUE**

**Par**

**AHMED TERROUCHE**

**Devant le jury :**

|                   |                            |                       |                                       |
|-------------------|----------------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| <b>Président</b>  | <b>: M. C. MOUATS,</b>     | <b>Professeur</b>     | <b>Université Mentouri-Constantin</b> |
| <b>Rapporteur</b> | <b>: M.H. ALI-KHOUDJA,</b> | <b>Professeur</b>     | <b>Université Mentouri-Constantin</b> |
| <b>Examineur</b>  | <b>: M. A. HAOUAM,</b>     | <b>Professeur</b>     | <b>Université Mentouri-Constantin</b> |
| <b>Examineur</b>  | <b>: M.A. DERRADJI,</b>    | <b>M. Conférences</b> | <b>Université Badji-Mokhtar-Annab</b> |

Soutenance Prévue : 04 juillet 2009

## **Remerciements**

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères au professeur H.ALI-KHOUDJA pour avoir accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire et de diriger ce travail de recherche. Il m'a accordé sa confiance tout au long de ces quelques années et je lui en suis vraiment très reconnaissant.

Je tiens à témoigner ici ma reconnaissance à Monsieur A. DERRADJI, maître de Conférences à l'Université Badji-Mokhtar-Annaba, d'avoir accepté d'examiner ce mémoire et de faire partie de ce jury.

Il m'est agréable d'associer à ces remerciements Monsieur. A. HAOUAM Professeur à l'Université Mentouri de Constantine et Monsieur. C. MOUATS Professeur à l'Université Mentouri de Constantine d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je remercie aussi ma famille, et en particulier mes parents, pour leur patience et la compréhension dont ils ont fait preuve tout au long de mes études.

Enfin, c'est avec beaucoup de plaisir qu'il m'est donné aujourd'hui d'exprimer ma vive reconnaissance à l'ensemble des chercheurs, qui par leur gentillesse, leur modestie, leur aide, leur conseil et leur encouragement, ont fortement contribué à la réalisation de ce travail et particulièrement à moukhtar et nour.

# **TABLE DES MATIERES**

|  |    |
|--|----|
| <b>Introduction générale</b> .....                                   | 1  |
| <b>Chapitre I : synthèse bibliographique</b>                         |    |
| I.1. Une définition des COV.....                                     | 3  |
| I.2. Origines des émissions des COV.....                             | 4  |
| I.2.1. Introduction.....   | 4  |
| I.2.2. Sources biogéniques.....                                      | 4  |
| I.2.3. Sources anthropiques.....                                     | 5  |
| I.3. Effets et impacts des COV.....                                  | 6  |
| I.3.1. Effets des COV sur l'environnement.....                       | 6  |
| I.3.2. Effets sur la santé.....                                      | 7  |
| I.3.2.1. Effets directs.....   | 7  |
| I.3.2.2. Effets indirects.....                                       | 9  |
| I.4. Mesures de réduction des émissions de COV.....                  | 10 |
| I.4.1. Oxydation des COV.....  | 11 |
| I.4.1.1. L'oxydation thermique.....                                  | 11 |
| I.4.1.2. L'oxydation catalytique.....                                | 12 |
| I.4.1.3. Irradiation.....  | 13 |
| I.4.1.3.1. Electricité haut voltage.....                             | 13 |
| I.4.1.3.2. UV (photo-oxydation).....                                 | 13 |
| I.4.1.3.3. Plasma.....   | 13 |
| I.4.1.3.4. Photocatalyse.....  | 14 |
| I.4.1.4. Procédés biologiques.....                                   | 14 |
| I.4.1.4.1. Les biolaveurs.....                                       | 15 |
| I.4.1.4.2. Les filtres percolateurs (biotrickling).....              | 15 |
| I.4.1.4.3. Les Biofiltres.....                                       | 16 |
| I.5. La Dégradation de la matière organique par voie biologique..... | 17 |
| I.5.1. Les facteurs biologiques de la biodégradation.....            | 17 |
| I.5.1.1. Les micro-organismes.....                                   | 17 |
| I.5.1.2. Les enzymes.....  | 17 |
| I.5.2. La biodégradation aérobie et anaérobie.....                   | 18 |

|   |    |
|---|----|
| I.5.2.1. Introduction.....  | 18 |
| I.5.2.2. La biodégradation aérobie.....                             | 18 |
| I.5.2.3. La biodégradation anaérobie.....                           | 18 |
| I.5.3. Description de la cinétique de croissance microbienne.....   | 19 |
| I.5.4. Quelques rappels sur le monde microbien.....                 | 21 |
| I.5.4.1. Les Bactéries.....   | 22 |
| I.5.4.2. Les Moisissures et levures.....                            | 23 |
| I.5.4.3. Métabolites, toxines ou fragments de micro-organismes..... | 25 |
| I.5.4.4. Conditions de croissance.....                              | 26 |
| I.5.4.4.1. Les besoins nutritionnels.....                           | 27 |
| I.5.4.4.1.1. Les macromolécules nutritives.....                     | 27 |
| I.5.4.4.1.2. Les microsubstances nutritives.....                    | 30 |
| I.5.4.4.2. Influence de l'environnement.....                        | 31 |
| I.6. Informations générales sur la méthyl éthyl cétone .....        | 31 |
| I.6.1. Principaux synonymes.....                                    | 31 |
| I.6.2. Utilisation et sources d'émission.....                       | 32 |
| I.6.3. Propriétés physiques de MEK.....                             | 33 |
| I.6.4. Toxicocinétique.....   | 33 |

## **Chapitre II : matériels et méthodes**

|  |    |
|--|----|
| II.1. Origine du consortium.....   | 35 |
| II.2. Description du réacteur batch.....                                     | 35 |
| II.3. Milieu nutritif.....   | 35 |
| II.4. Conditions opératoires de culture.....                                 | 36 |
| II.5. Calcul de la charge maximal de MEK biodégradable dans un réacteur..... | 37 |
| II.6. Obtention des micro-organismes pour constituer l'inoculum.....         | 37 |
| II.7. Prélèvements.....  | 39 |
| II.8. Suivi de la croissance du consortium.....                              | 39 |
| II.9. Suivre la consommation de la MEK.....                                  | 40 |

## **Chapitre III : traitement des résultats**

|   |    |
|---|----|
| III.1. Introduction.....  | 41 |
| III.2. Influence de la concentration initiale en substrat $S_0$ ..... | 41 |

|              |  |    |
|--------------|--|----|
| III.2.1.     | Introduction.....  | 41 |
| III.2.2.     | Modélisation.....  | 43 |
| III.2.2.1.   | Modélisation de la croissance.....   | 43 |
| III.2.2.2.   | Modélisation de la consommation du MEK.....  | 44 |
| III.2.3.     | La concentration initiale en substrat ( $S_0$ ) en fonction du temps<br>nécessaire pour la dégradation total du MEK..... | 45 |
| III.2.4.     | Le taux spécifique de croissance.....  | 47 |
| III.2.5.     | Le taux spécifique de croissance et la concentration initiale du substrat..<br>.....                                     | 56 |
| III.2.5.1.   | Modélisation.....  | 56 |
| III.2.5.1.1. | Le Modèle de Monod.....  | 56 |
| III.2.5.1.2. | Le Modèle d'Haldane.....   | 57 |
| III.2.6.     | La vitesse spécifique de consommation de la MEK.....   | 58 |
| III.2.7.     | Rendement de conversion de la MEK en biomasse.....   | 62 |
| III.2.8.     | Discussion.....  | 63 |
| III.2.8.1.   | Croissance et dégradation.....   | 63 |
| III.2.8.2.   | Taux spécifique de croissance en fonction du temps et de la<br>concentration en MEK résiduelle.....                      | 63 |
| III.2.8.3.   | Taux spécifique de croissance en fonction de la<br>concentration initiale du MEK.....                                    | 64 |
| III.2.8.4.   | Vitesse spécifique de consommation de la MEK en fonction<br>du temps.....  | 64 |
| III.3.       | Influence de la présence d'une autre source de carbone sur la dégradation du<br>MEK.....                                 | 65 |
| III.3.1.     | Introduction.....  | 65 |
| III.3.2.     | Modélisation.....  | 68 |
| III.3.2.1.   | Modélisation de la croissance.....   | 68 |
| III.3.2.2.   | Modélisation de la consommation de mélange (MEK /Acétone).<br>.....  | 68 |
| III.3.3.     | Le Taux spécifique de croissance.....  | 69 |
| III.3.4.     | Le taux spécifique de croissance et la concentration initiale du substrat...77   |    |
| III.3.5.     | La vitesse spécifique de consommation des substrats.....   | 78 |
| III.3.6.     | Rendement de conversion des substrats en biomasse.....   | 85 |

|  |           |
|--|-----------|
| III.3.7. Discussion.....   | 86        |
| III.3.7.1. Croissance et dégradation.....  | 86        |
| III.3.7.2. Le taux spécifique de croissance et la concentration initiale du<br>substrat.....         | 87        |
| III.3.7.3. Vitesse spécifique de consommation des substrats.....                                     | 88        |
| III.4. Influence de la concentration initiale de biomasse $X_0$ .....                                | 88        |
| III.4.1. Introduction.....   | 88        |
| III.4.2. Le Taux spécifique de croissance.....   | 90        |
| III.4.3. Le Taux spécifique de croissance et la concentration initiale de biomasse<br>( $X_0$ )..... | 92        |
| <b>Conclusion générale.....</b>  | <b>93</b> |

## **Introduction générale**

Les préoccupations environnementales prennent, de nos jours, une importance sans cesse croissante. Dans ce contexte, la protection de l'atmosphère par le contrôle des émissions gazeuses chargées en polluants devient un enjeu environnemental majeur.

Parmi les différentes sources de pollution de l'atmosphère, les industries émettrices de rejets chargés en composés organiques volatils (COV) font l'objet d'une attention particulière. En effet, les COV sont des polluants avérés de la basse atmosphère de par leurs impacts sur l'environnement et la santé humaine.

La méthyléthylcétone (MEK), dont l'élimination des vapeurs de l'atmosphère est l'objet de notre étude, sert principalement de solvant, en particulier dans les divers revêtements, comme le vinyle, les adhésifs, la nitrocellulose et les revêtements à l'acrylique, dans les décapants à peinture, les vernis, les peintures en aérosol, les bouche-pores, les colles, les rubans magnétiques, les encres d'imprimerie, les résines, la colophane, les solutions de nettoyage et la polymérisation. Elle est utilisée dans les huiles lubrifiantes de déparaffinage, le dégraissage des métaux, la production de cuirs synthétiques, le papier transparent et le papier d'aluminium. Elle sert aussi d'intermédiaire chimique et de catalyseur. Elle sert de solvant d'extraction dans la transformation des produits et des ingrédients alimentaires. La MEK est extrêmement inflammable sous forme de liquide et de vapeurs. Les vapeurs qui sont plus denses que l'air peuvent se répandre sur de grandes distances et entraîner la possibilité d'allumage à distance et de retour de flamme. La MEK est très volatile. Il s'agit d'un irritant oculaire, d'un irritant de l'appareil respiratoire et d'un dépresseur du système nerveux central. De fortes concentrations peuvent causer des maux de tête, des nausées, des étourdissements, de la somnolence, de l'incoordination et de la confusion.

C'est ainsi que les rejets toxiques d'industries utilisatrices de solvants sont soumis à des réglementations de plus en plus strictes, contraignant l'industriel à établir des stratégies de réduction des émissions.

Afin de répondre à cette attente, il apparaît nécessaire de s'orienter vers des techniques de traitement. Parmi les techniques existantes, les procédés biologiques apparaissent comme une alternative intéressante. Ils exploitent la diversité fonctionnelle des micro-organismes dans le but de métaboliser les polluants présents dans les effluents

gazeux. Leurs impacts environnementaux mineurs, leur bonne image auprès du grand public et leurs coûts modérés en termes d'investissement et de fonctionnement comparé aux techniques physico-chimiques, sont des arguments qui plaident pour leur développement et leur utilisation.

Le premier chapitre de cette étude présente la problématique de la présence des COV dans l'atmosphère. La définition de ces composés, les aspects législatifs qui leur sont liés, leurs utilisations et sources de rejets ainsi que leurs impacts sur la santé et l'environnement sont tout d'abord exposés. Les différentes techniques de traitement sont également présentées.

Les matériels, ainsi que les différentes techniques d'analyse de la dégradation et de la croissance sont décrits dans le chapitre II.

Dans le troisième chapitre nous avons étudié la cinétique de croissance d'un consortium en présence de MEK dans un réacteur batch, l'influence de la concentration initiale en biomasse et en MEK ainsi que l'influence de la présence de l'acétone sur la biodégradation de la MEK.



### I.1. Définition des COV

Il n'y a pas d'accord sur une définition exacte des COV. D'une manière générale les COV sont des substances organiques, c'est-à-dire contenant au moins un atome de carbone, qui passent facilement à l'état de gaz.

Dans le langage courant, les COV sont souvent synonymes des solvants organiques. Aux Etats-Unis, sous l'influence des problèmes environnementaux, on appelle COV tous les composés organiques qui contribuent à la création de l'ozone photochimique. La plupart des définitions reposent sur les propriétés physiques et chimiques de ces composés : le point d'ébullition, l'équilibre gaz/liquide ou la tension de vapeur.

La propriété qui est généralement prise en compte est la pression de vapeur saturante. Aux Etats-Unis, les COV sont des composés organiques dont la pression de vapeur est au-dessus de 13,3 Pa à 25 °C (Dewulf et Langenhove, 2002). En Europe, la Directive 1999/13/CE du Conseil du 11 mars 1999 définit les COV comme des produits chimiques organiques dont la pression de vapeur est au-dessus de 10 Pa à 20°C. En Australie les COV sont définis comme des composés chimiques ayant une pression de vapeur supérieure à 0,27 kPa à 25 °C (Dewulf et Langenhove, 2002).

Les divergences qui existent au niveau de la définition des COV rendent difficile de dresser une liste exhaustive de ces composés.

Ils incluent un éventail très large de différentes substances.

Rafson (1998) répertorie environ 500 COV. Les familles de COV qui reviennent le plus souvent dans la littérature sont :

- Les aliphatiques (heptane, hexane, pentane, ...)
- Les aromatiques (benzène, toluène, éthylbenzène et xylène appelé aussi famille des BTEX)
- Les alcools (éthanol, méthanol, butanol, IPA : alcool isopropanol ...)
- Les cétones (acétone, méthyléthylcétone, cyclohexanone...)
- Les esters (acétates d'éthyle, de butyle, d'isopropyle...)
- Les composés chlorés (perchloréthylène, trichloréthylène, dichlorométhane)
- Les composés azotés (amines, nitriles...)
- Les composés soufrés (mercaptans, diméthylsulfure...)
- Les éthers (1,4-Dioxane)
- Les aldéhydes (formaldéhyde)

## **I.2. Origines des émissions des COV**

### **I.2.1. Introduction**

L'origine des COV est multiple. En effet, ce sont des composés émis de façon naturelle par les processus géologiques ou biologiques (origine biogénique tant animale que végétale) mais aussi par les activités humaines du fait de leur utilisation directe dans les processus industriels, majoritairement sous la forme de solvants mais aussi de façon indirecte lors de la combustion d'hydrocarbures notamment (origine anthropique). En raison de leur forte volatilité, ces composés sont très majoritairement émis dans la troposphère sous forme de gaz. Une fois dans l'atmosphère, les COV interagissent avec les différentes phases (gaz, liquide, solide) et sont soumis à de très nombreuses réactions chimiques.

### **I.2.2. Sources biogéniques**

Les mesures d'émissions de COV des végétaux ont mis en évidence l'importance de ces sources de COV. Helmig *et al.* (1999) et Janson et Serves (2001) ont montré que les émissions d'acétone varient fortement en fonction de l'espèce considérée. De plus, ces émissions sont fonction de la latitude, la température, l'ensoleillement, du stress de la plante ou de l'humidité notamment. Kirstine *et al.* (1998) ont mesuré les émissions de COV de pâturages (herbe et trèfle) et ont observé la production d'acétone, du MEK et de MIBK (Tableau 1). La MEK apparaît comme le composé le plus important et représente pour le trèfle près de 50 % des COV émis. De plus, les résultats obtenus montrent que le stress de la plante influe sur les émissions de COV, par exemple, lors de la tonte de la prairie étudiée, les émissions de COV augmentent de 80 à 180 fois pour le trèfle et l'herbe respectivement. Les émissions de COV représenteraient, selon Kirstine *et al.* (1998), 0,25% du carbone fixé par ces plantes.

**Tableau 1.** Emission d'acétone et du MEK par le trèfle et l'herbe de pâturage en microgramme de carbone par mètre carré et par heure, d'après Kirstine *et al.* (1998).

|         | Emission en µg de C /m <sup>2</sup> .heure |       |
|---------|--|-------|
|         | Trèfle                                     | Herbe |
| acétone | 0,25                                       | 0,06  |
| MEK     | 0,86                                       | 0,01  |
| MIBK    | 0,003                                      | 0,002 |

L'origine des émissions de COV par les plantes est relativement méconnue. Cependant, Fall *et al.* (2001) proposent une explication à ces émissions. En effet, les plantes émettent du cyanure d'hydrogène comme moyen de défense contre d'éventuels «prédateurs» comme les herbivores. Le cyanure d'hydrogène est stocké dans les cellules sous forme d'acides aminés. Les composés carbonylés émis sont des déchets de cette réaction de défense. Selon Fall *et al.* (2001), un tel phénomène aurait déjà été répertorié sur plus d'un millier d'espèces de plantes.

Les plantes ne sont pas les seules sources de COV biogéniques. Les océans jouent aussi le rôle de puits et de sources d'acétone, du MEK et de méthylglyoxal par exemple selon Zhou et Opper (1997). L'origine de ces composés est due à la photodégradation de la matière organique dissoute à la surface des océans.

### **I.2.3. Sources anthropiques**

Les COV peuvent aussi être directement issus des activités humaines. En effet, les composés carbonylés dont l'acétone, la MEK, le MIBK et le méthylglyoxal, sont présents dans les carburants automobiles et sont émis lors de la combustion incomplète de ces carburants (Kean *et al.*, 2001 ; Staehelin *et al.*, 1998). Avec l'utilisation de plus en plus grande d'essences dite de nouvelle génération contenant de plus en plus de composés oxygénés comme substituts aux composés organiques plus toxiques, les émissions de ces COV sont en augmentation.

Les feux de forêts, dont la majorité est issue des activités humaines, sont aussi d'importantes sources de COV. En effet, d'après les simulations faites en laboratoire par Holzinger *et al.* (1999), les feux de forêts et de savanes sont des grands émetteurs de COV

Les émissions en COV anthropiques peuvent aussi être directement liées à leur utilisation dans les activités humaines principalement par un processus d'évaporation. C'est le cas par exemple du formate d'éthyle qui est utilisé comme solvant pour la nitrocellulose, insecticide et larvicide pour les cultures de tabac et céréales et même comme agent de saveur pour la limonade (Health Council of the Netherlands, 2002).

Le NMP ou *N*-méthyl, pyrrolidinone est un solvant organique dont l'usage est croissant car il constitue un excellent substituant aux hydrocarbures chlorés très toxiques. Son usage couvre un large spectre de domaines allant de l'industrie pétrochimique où il peut être utilisé comme catalyseur, à l'industrie de la microélectronique où il est utilisé dans les processus de nettoyage, en passant par la fabrication de pigments, cosmétiques, médicaments, produits phytosanitaires.

### **I.3. Effets et impacts des COV**

La présence de COV dans l'atmosphère présente des risques directs et indirects pour la santé humaine et pour l'environnement. Cependant, c'est un sujet complexe et encore mal connu du fait de la rareté des travaux réalisés. Ce paragraphe présente les effets les mieux étudiés de certains COV sur l'environnement et la santé humaine.

#### **I.3.1. Effets des COV sur l'environnement**

L'effet principal des COV sur l'environnement est lié à leur participation à des réactions photochimiques complexes avec d'autres composés présents dans l'atmosphère.

En présence d'oxydes d'azote et du rayonnement solaire, ils contribuent à la formation de composés oxydés et nitrés dont les plus connus sont les Peroxy-Acyle Nitrate (PAN). Ils font aussi partie des gaz précurseurs de l'ozone troposphérique (basse atmosphère) en se conjuguant avec les oxydes d'azote. L'ozone est présent de manière naturelle dans l'air et il se forme par combinaison d'un atome de dioxygène et d'un atome d'oxygène provenant de la dissociation d'une molécule de dioxyde d'azote sous l'effet du rayonnement solaire. Cette apparition d'ozone est régulée par la réaction inverse puisque O<sub>3</sub> se recombine avec le monoxyde d'azote précédemment créé. Cependant la présence de COV provoque une modification de ce cycle.

En effet, ceux-ci sont transformés en composés radicalaires au fort pouvoir oxydant qui se combinent avec le monoxyde d'azote pour former du dioxyde d'azote. Un excès

d'ozone est alors généré, aboutissant à un déséquilibre entre les concentrations d'ozone et de dioxygène dans l'air, la réaction étant défavorisée. Cet ozone va alors s'accumuler dans l'atmosphère. La présence d'ozone dans la basse atmosphère est aussi à l'origine de divers problèmes écologiques notamment la perturbation de la photosynthèse des végétaux (forêts et cultures). De plus, les COV sont également impliqués dans le phénomène des pluies acides à l'origine de graves dégâts principalement dans les zones forestières.

Mais à l'heure actuelle, le problème majeur reste l'augmentation de l'effet de serre et donc le réchauffement accéléré de la planète. La part de l'ozone participant à l'effet de serre total est estimée à 18 % sur l'ensemble de la planète. A ce titre, une réduction de 70 à 80 % de la teneur en COV est estimée indispensable pour réduire significativement les concentrations élevées en photo-oxydants (Le Cloirec, 1998).

Enfin du fait de flaques accidentelles, de fuites sur des réservoirs de stockage souterrains, ou de décharges de produits non contrôlés, une pollution de certains sols a été observée (Braidia et Ong, 2000).

### **I.3.2. Effets sur la santé**

Les troubles causés par les COV sur la santé peuvent aller de simples irritations à des troubles beaucoup plus sévères comme des problèmes cardiaques ou l'apparition de cancers. A ce titre ils constituent donc un problème sanitaire à prendre en compte.

#### **I.3.2.1. Effets directs**

Les COV présentent un caractère irritant pour les yeux, la peau, et les muqueuses. Les solvants à base de composés halogénés ou aromatiques comme le chloroforme ou le styrène entraînent des irritations cutanées et plus particulièrement des tissus adipeux (Lauwerys, 1992). Une exposition à certains composés aromatiques peut également entraîner des irritations des yeux (Das *et al.*, 1991). Par ailleurs, à des concentrations plus élevées, d'autres COV sont aussi à l'origine de troubles cardiaques comme le toluène, le chloroforme ou le trichlorométhane (Lauwerys, 1992). Enfin, certains composés sont connus pour induire des cancers; parmi eux, seulement 17 COV différents induisaient 2000 cas de cancers par an aux Etats-Unis d'après l'EPA (Hill *et al.*, 1991). De plus, il a été montré qu'une exposition aux BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène, xylène) pouvait entraîner le cancer de la vessie par exemple (Foo, 1991). Les hydrocarbures halogénés sont

eux reconnus pour leurs effets mutagènes, et pour leurs effets néfastes sur le système nerveux provoquant généralement un état d'excitation proche de l'état d'ivresse alcoolique suivi d'une dépression du système nerveux (Lauwerys, 1992). Le tableau 2 présente les maladies associées à certains COV.

**Tableau. 2** Impacts et effets de certains COV sur la santé humain (Hill *et al.*, 1991)

| <b>Composées</b>   | <b>Maladies Induites</b>                     |
|--------------------|--|
| Phénol             | Irritations du système respiratoire & effets |
| Toluène            | Attaques du système nerveux & effets         |
| Trichloréthylène   | Effets cancérogènes & attaques du système    |
| Chlorure de Vinyle | Effets cancérogènes                          |
| Benzène            | Effets cancérogènes (leucémie)               |
| Tétrachlorure de   | Effets cancérogènes (cancer du foie)         |
| Crésol             | Irritations cutanées & maladies du foie      |
| Chlorure de        | Effets cancérogènes & attaques du système    |

Ainsi, vu les risques sanitaires encourus, l'INERIS (Institut National d'Etudes des Risques Industriels et Sanitaires) fixe pour certains composés, une valeur limite de seuil d'exposition pour protéger les utilisateurs de solvants à des expositions chroniques (VME) ou aiguës (VLE). La VME (Valeur Moyenne d'Exposition) est la concentration moyenne maximale admissible pondérée pour une durée de travail de 8 heures/jour et de 40 h/semaine; la VLE (Valeur Limite d'Exposition) est la concentration maximale ne pouvant être dépassée pour une exposition supérieure à 15 minutes. Le tableau 3 présente ces valeurs pour un certains nombre de COV.

**Tableau. 3** VME et VLE pour quelques COV couramment utilisés (Dusserre *et al.*, 1998)

| Composées    | VLE (mg/m <sup>3</sup> ) | VME (mg/m <sup>3</sup> ) |
|--------------|--------------------------|--------------------------|
| Acétate de   | ND                       | 150                      |
| Benzène      | 25                       | 5                        |
| Acétone      | ND                       | 750                      |
| Dichloromét  | 100                      | 50                       |
| Formaldéhy   | 1                        | 0,5                      |
| Hexane       | ND                       | 50                       |
| Méthanol     | 1000                     | 200                      |
| Trichloréthy | 200                      | 75                       |
| Toluène      | 150                      | 100                      |
| Xylène       | 150                      | 100                      |

Enfin, il faut noter la gêne olfactive provoquée par la présence de certains COV dans l'atmosphère. A proximité des installations émettrices de solvants, cette gêne est effective pour le voisinage ainsi que pour le personnel travaillant à l'intérieur des ateliers. Les composés susceptibles de générer des mauvaises odeurs sont les composés soufrés (mercaptans) (Humeau *et al.*, 1999; Hansen et Rindel, 2000). Mais un grand nombre d'autres COV occasionnent des gênes olfactives comme les alcools, les aldéhydes, les composés aminés ou les hétérocycles (Derek et Sercombe, 1995). Tous ces composés génèrent une gêne olfactive de par leurs faibles seuils de perception, inférieurs en moyenne à 1mg/m<sup>3</sup> (Humeau *et al.*, 1999). Même s'il n'y a pas de nocivité avérée de ces composés, ces rejets sont considérés comme des pollutions atmosphériques par la gêne qu'ils engendrent.

### I.3.2.2. Effets indirects

Les COV sont des précurseurs de l'ozone troposphérique, reconnu pour ses effets irritants et toxiques. A ce titre, une étude menée par l'Institut Français de Veille Sanitaire (InVS) (Institut de Veille Sanitaire, 1999) évalue une augmentation de la mortalité quotidienne de 2 à 3% pour une augmentation de 50 µg/m<sup>3</sup> de la teneur moyenne en ozone pendant huit heures. La présence de COV dans l'atmosphère a donc des effets néfastes aussi bien sur l'environnement (avec pour principal impact l'effet de serre) que sur la santé

humaine. Des réglementations ont donc été mises en place afin de limiter les émissions des différentes sources de pollution anthropique.

#### **I.4. Mesures de réduction des émissions de COV**

Plusieurs options se présentent pour la réduction des émissions de COV :

- remplacement des COV par d'autres substances, substitution des produits à forte teneur, utilisation de COV moins nocifs,
- modification des pratiques de gestion,
- modification des procédés,
- recyclage et récupération des COV,
- destruction des COV.

Si aucune solution préventive ou récupérative n'est techniquement possible ou économiquement abordable, il ne reste plus qu'à traiter les effluents chargés de COV.

En première étape, il faut identifier l'origine des effluents et mettre en place un système de captage. Pour des raisons économiques, on va essayer de minimiser les volumes d'air à véhiculer et à traiter sans pour autant dépasser en aucun point du réseau une concentration en COV entraînant des risques d'explosion.

Il existe deux principes de traitement des COV: l'oxydation (destruction) et la récupération. Pour ce qui est de l'oxydation, on distingue entre l'incinération thermique (régénérative et récupérative), l'incinération catalytique (régénérative et récupérative), l'irradiation (UV, plasma, faisceau d'électrons, photo-oxydation) et les procédés biologiques (biofiltres, biolaveurs, biotrickling).

La récupération peut se faire par absorption ou lavage, par adsorption, par condensation ou par séparation membranaire.

L'emploi des différentes techniques dépend de

- l'effluent: débit de gaz (valeur absolue, variations), niveau de température, composition des COV (nature, complexité du mélange, variabilité des concentrations), présence de particules et d'eau, limites inférieure et supérieure d'explosion,
- d'autres conditions telles que : objectif d'épuration, optimisation du procédé en amont, impact sur le procédé de fabrication, adaptabilité aux modifications ultérieures du procédé, sources d'énergie disponibles, possibilités de valorisation d'énergie, possibilité de



récupération des matières premières, traitement des eaux résiduaires, déchets, sécurité, maintenance, compétences humaines, place disponible, prix, etc.

- La détermination du meilleur procédé de traitement exige donc une analyse détaillée pour chaque établissement.

Les différentes techniques sont décrites plus explicitement dans les paragraphes suivants.

#### **I.4.1. Oxydation des COV**

Tous les COV peuvent être transformés par oxydation totale en composés inorganiques. Les produits d'oxydation dépendent du COV à détruire. Selon la composition du COV à oxyder, les composés formés sont soit uniquement du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et de l'eau (H<sub>2</sub>O), soit un mélange de CO<sub>2</sub>, de H<sub>2</sub>O et d'autres produits d'oxydation. Parmi ces derniers figurent par exemple le NO, le HCl, le SO<sub>2</sub> ainsi que les dioxines (polluants secondaires). Dans ce cas, un traitement des fumées en aval de l'incinérateur est éventuellement à prévoir.

Pour que les COV s'oxydent, une certaine vitesse de réaction est indispensable. Elle peut être atteinte par augmentation de la température, par diminution de l'énergie d'activation nécessaire, par augmentation de la quantité d'oxygène ou par augmentation de la teneur en polluants. Trois facteurs déterminent donc le bon fonctionnement de l'oxydation: température, turbulence et temps de séjour.

##### **I.4.1.1. L'oxydation thermique**

L'oxydation thermique est également appelée «incinération thermique». Elle représente 80 % des installations de traitement actuellement en fonctionnement.

Un incinérateur thermique est composé d'une chambre de combustion munie d'un brûleur ou (plus rarement) préchauffée électriquement et d'un système d'échange thermique.

Le brûleur est alimenté avec l'effluent à traiter, avec de l'air et, si nécessaire, avec le combustible d'appoint. Ce dernier n'est pas ajouté, si la concentration en COV est assez élevée de manière à ce que la température libérée par leur oxydation est suffisamment haute pour maintenir la température d'oxydation nécessaire dans l'incinérateur. L'incinération fonctionne alors en autothermie.

#### **I.4.1.2. L'oxydation catalytique**

Hormis le lit catalytique, l'oxydation catalytique est peu différente de l'oxydation thermique. Elle se déroule à des températures inférieures aux températures de l'oxydation thermique, la plage de température étant de 200-600 °C (la température est plus élevée pour les COV halogénés).

La présence d'un catalyseur permet cette réduction de température et, par conséquent, une réduction de la quantité de gasoil à ajouter au processus. La récupération d'énergie peut se faire par système récupératif ou régénératif. Le catalyseur se compose d'une espèce active (métaux précieux, par exemple le platine ou oxydes métalliques, par exemple à base de chrome, de fer ou de nickel) en forme de billes, de pastilles, de granulés, d'extrudé, de nid d'abeilles, etc., qui est déposée sur un support inorganique comme par exemple l'alumine ou la céramique. Il n'est pas consommé dans le procédé, mais son fonctionnement peut être atténué dans le temps par empoisonnement (halogènes, phosphore, silicones et certains métaux s'y déposent), par un masquage des surfaces actives par les poussières, par une perte de matière (attrition) ou par des températures trop élevées (dégradation thermique). Il est très important de connaître la composition des gaz à traiter afin d'éviter un endommagement du catalyseur. Les catalyseurs «usés» doivent être régénérés ou remplacés.

Muni d'un échangeur d'énergie type «récupératif», la température d'oxydation est en général de 200-450 °C et l'autothermie est possible à partir de 2-4 g/Nm<sup>3</sup>. Un rendement thermique de ± 80 % est possible.

Muni d'un échangeur d'énergie type «régénératif», la température d'oxydation est en général de 300-500 °C et l'autothermie est possible à partir d'environ 1 g/Nm<sup>3</sup>. Un rendement thermique de 90-95 % est possible.

Bien qu'en général l'oxydation thermique catalytique produise moins de NOx que l'oxydation thermique non catalytique (les azotes proviennent de l'air de combustion et leur concentration est fonction de la température d'oxydation), il faut surveiller la libération d'azote chimiquement lié dans les produits à oxyder.

Une réduction des coûts est essentiellement possible par le bon choix du catalyseur et le développement de catalyseurs moins sensibles à l'empoisonnement et travaillant à plus basse température.

### **I.4.1.3. Irradiation**

#### **I.4.1.3.1. Electricité haut voltage**

Dans un réacteur Corona, de l'électricité haut voltage est utilisée pour détruire les COV. Le réacteur est par exemple un tube en verre rempli de billes de verre. A l'extérieur du tube, une couche de métal mise à la terre est appliquée. Une électrode haut voltage traverse le tube dans le sens de la longueur, le voltage et l'intensité du courant sont réglés en fonction du COV à détruire. De par cette électrode, des faisceaux d'électrons à haute vitesse bombardent les COV, créant des radicaux libres qui rompent leurs liaisons chimiques. Le produit restant de cette destruction des COV est un mélange d'eau, du dioxyde de carbone et de sel. Le procédé fonctionne à température ambiante, avec une efficacité de l'ordre de 99,99%. Il se prête particulièrement au traitement du trichloréthylène, du tétrachlorure de carbone et du benzène.

#### **I.4.1.3.2. UV (photo-oxydation)**

La destruction des COV gazeux est réalisée en les exposant à de la lumière UV haute intensité, leurs liens chimiques sont ainsi brisés. On peut aussi oxyder les COV en les mettant en contact avec des oxydants tels que l'ozone, les peroxydes ou les radicaux OH<sup>-</sup> et O<sup>-</sup> sous un rayonnement ultraviolet de 150 à 250 nm.

#### **I.4.1.3.3. Plasma**

La technique du plasma - plutôt connue pour le traitement de surfaces - élimine les COV en ayant recours à un plasma non thermique (oxydation froide) qui détruit les COV en les exposant à l'action des micro-ondes. Ces micro-ondes ionisent l'oxygène de l'air, produisant ainsi un plasma d'électrons et de radicaux hydroxyles et azotyles qui dissocient les COV en dioxyde de carbone et eau. Cette technique s'applique principalement à des effluents à faible concentration. Les coûts d'investissement et d'exploitation sont peu élevés par rapport à d'autres techniques; elle convient par ce fait parfaitement aux petites entreprises présentant un flux de solvants de faible volume (par exemple cabines de peinture au pistolet).

#### **I.4.1.3.4. Photocatalyse**

La photocatalyse fonctionne moyennant un semi-conducteur (en général du dioxyde de titane TiO<sub>2</sub>) et un rayonnement lumineux (UV ou visible). Sous l'action du rayonnement, le semi-conducteur produit des radicaux très oxydants qui détruisent des polluants adsorbés à sa surface. Cette technique s'apprête pour les effluents gazeux faiblement pollués à débits faibles à moyens.

#### **I.4.1.4. Procédés biologiques**

Le traitement biologique imite les mécanismes auto-épurgateurs de la nature dans une application technique. A condition qu'ils soient solubles dans l'eau, biodégradables et en concentration acceptable, les COV peuvent être dégradés par des micro-organismes à qui ils servent comme source de carbone pour leur biosynthèse et comme source d'énergie. L'oxydation complète d'un substrat carboné organique conduit à la formation de biomasse et de composés minéraux (CO<sub>2</sub> et NO<sub>x</sub>).

Les micro-organismes sont pour la plupart des bactéries, des champignons, des moisissures, des levures ou des algues microscopiques. Leur activité métabolique ainsi que leur croissance dépendent de la présence des éléments nutritifs (carbone, azote, phosphore, soufre, ...), du degré d'humidité, du pH et de la température (idéal : 20-40 °C) du milieu. Tandis que des COV facilement dégradables comme les alcools, les acides, les esters et les cétones peuvent être dégradés par presque tout type de micro-organisme, ceci n'est pas le cas pour les substances plus difficilement dégradables (par exemple solvants chlorés, composés aromatiques). Pour de tels composés, il s'avère utile et/ou nécessaire de sélectionner des micro-organismes particulièrement adaptés à la décomposition de telles substances.

La dégradation s'effectue toujours en deux étapes : absorption des COV dans la phase aqueuse, puis oxydation des COV. On distingue plusieurs types de procédés:

- les biolaveurs,
- les filtres percolants,
- les biofiltres.

Les systèmes biologiques sont tous insensibles aux variations en charge et supportent même des périodes de non alimentation. Comme les micro-organismes se développent en fonction des COV, un changement de la composition des COV peut également être

envisagé, ceci toutefois à condition de ne pas ajouter des COV toxiques pour les micro-organismes.

#### **I.4.1.4.1. Les biolaveurs**

Dans les biolaveurs, deux étapes se déroulent séparément: l'absorption est effectuée dans une tour de lavage à pulvérisation (les biolaveurs s'appliquent donc en principe uniquement aux COV hydrosolubles) tandis que la biodégradation se fait dans un bassin d'activation contenant de la biomasse en suspension. Après le lavage, l'eau chargée en COV est donc traitée dans un réacteur à boues activées. L'eau circule en circuit fermé: elle traverse d'abord le biolaveur, puis le réacteur, puis de nouveau le biolaveur.

#### **I.4.1.4.2. Les filtres percolateurs (biotrickling)**

Les filtres percolateurs sont une combinaison de biolaveurs et de biofiltres. Dans les filtres percolateurs, le biofilm se développe à la surface d'un support fixe en matériau inerte («filtre») ayant une structure garantissant une surface de contact maximale entre l'air vicié et l'eau. Il peut atteindre plusieurs millimètres d'épaisseur. Ces micro-organismes produisent des enzymes capables de détruire les COV: ils sont transformés en dioxyde de carbone, en vapeur d'eau et en masse biologique.

Les COV et l'oxygène sont absorbés d'abord par l'eau d'arrosage puis transportés sous forme aqueuse vers le matériel de support. Autour du biofilm se crée ainsi une phase liquide à travers laquelle les COV et l'oxygène sont absorbés et transférés vers le biofilm. L'eau d'arrosage peut contenir le cas échéant un complément nutritif et du NaOH (neutralisation).

Par ce système, un grand nombre de COV, hydrosolubles et difficilement hydrosolubles (toluène, xylène, benzène, chlorure de méthylène, ...) peut être traité, les COV à haute concentration en chlore sont toutefois moins faciles à éliminer. Pour le traitement de certaines substances particulières, une «vaccination» de l'eau avec les souches adaptées peut être réalisée. La charge biologique est constamment renouvelée par élimination de la masse en surplus. Les boues qui se forment sont éliminées par simple décantation.

Pour une efficacité identique, le volume occupé est généralement moindre que celui d'un biofiltre.

A part les biofiltres percolateurs «classiques» à l'eau, il en existe également fonctionnant avec d'autres liquides comme par exemple avec une émulsion huile organique/eau. Ils sont destinés à élargir les possibilités de traitement à des composés non solubles dans l'eau ou toxiques à faible concentration, tels que le styrène, le benzène ou les solvants chlorés. Avec de l'huile de silicone, on peut par exemple obtenir une dégradation de 90% du toluène et du xylène, alors qu'elle est quasiment nulle avec de l'eau seule.

#### **I.4.1.4.3. Les biofiltres**

Dans les biofiltres, les micro-organismes sont fixés sur un matériau (tourbe, fibres, compost, écorces, copeaux de bois, billes en céramique, etc.) dans un réacteur que le flux chargé traverse de haut en bas, de bas en haut ou horizontalement. Sur ce matériau, qui est arrosé périodiquement, se forme un biofilm. Au passage de l'effluent, les COV y sont absorbés et oxydés.

Certaines substances qui ne peuvent pas être absorbées par les micro-organismes y sont adsorbées. Leur durée de séjour dans le filtre est ainsi prolongée. Ceci permet le développement de micro-organismes spécialisés pour l'oxydation de ces substances (si de tels micro-organismes ne faisaient pas partie du biofilm). On peut accélérer et stimuler l'oxydation des COV en vaccinant le lit biologique des souches utiles.

Afin de bien éliminer les COV, le matériau est épais de 0,5 à 1 mètre et son humidité relative doit être maintenue entre 40 et 60 % par l'aspersion périodique. L'écoulement des liquides (gaz et fluides) et leur répartition plus ou moins uniforme peut être favorisée par l'ajout d'éléments plus légers au matériel de base (par exemple copeaux, billes de polystyrène). Lors de l'aspersion, un apport nutritif complémentaire ou un apport de chaux afin de régler la valeur pH du milieu, est possible. Comme la présence d'eau et d'air et la densité de la masse ne sont pas uniformes, la capacité épurante peut considérablement varier. En principe, un biofiltre se régénère lui-même par élimination de la masse biologique en surplus. Cette masse et les eaux de percolation éventuellement en trop sont traitées par la suite.

Cette technique s'apprête surtout pour les COV non-chlorés. Elle existe en version ouverte et fermée. La dernière est préférée en raison des fortes odeurs émises par certaines composantes.

## **I.5. La dégradation de la matière organique par voie biologique**

### **I.5.1. Les facteurs biologiques de la biodégradation**

#### **I.5.1.1. Les micro-organismes**

Le terme « micro-organismes » couvre un groupe hétérogène d'êtres vivants de taille microscopique et pour la plupart, unicellulaires. Les micro-organismes appartiennent à deux principaux groupes :

- les procaryotes qui n'ont pas de noyau. Ils comprennent les eubactéries et archéobactéries, et
- les eucaryotes dont l'ADN est contenu dans un noyau délimité par une double membrane. Ils comprennent les protozoaires, les algues unicellulaires et les champignons.

Les champignons et les bactéries ont évolué durant des millions d'années et ont développé la capacité à dégrader toutes sortes de composés chimiques après une période d'adaptation.

#### **I.5.1.2. Les enzymes**

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques. Elles induisent des augmentations très importantes des vitesses de réaction dans un environnement qui, sans elles, ne serait pas favorable à ces réactions biochimiques. Elles sont produites par les cellules (animales, végétales ou microbiennes).

D'un point de vue structural, toutes les enzymes sont des protéines spécialisées de structure tridimensionnelle et dont les masses moléculaires varient entre  $10^3$  et  $10^6$  Da.

L'activité enzymatique d'un enzyme est reliée à la structure conformationnelle de ce dernier, qui présente certaines régions spécifiques à sa surface, formant ainsi un site actif. L'activité de l'enzyme disparaît avec la perte de sa conformation. L'interaction entre l'enzyme et le substrat a lieu sur ce site actif et conduit à la réaction chimique. Les sites actifs sont spécifiques pour un substrat donné ou une série de substrats.

Les enzymes sont classées en six groupes, selon leur activité : hydrolases, estérases, isomérases, réductases, lyases et ligases (Durand *et al.*, 1982 ; Lenz, 1993).

## **I.5.2. La biodégradation aérobie et anaérobie**

### **I.5.2.1. Introduction**

Les ordures ménagères, placées dans un milieu où la température et l'humidité sont adaptées, présentent toutes les conditions pour le développement d'une flore microbiologique capable de dégrader la matière organique biodégradable.

La biodégradabilité de substrats organiques solides dépend de leur disponibilité pour les micro-organismes. Les micro-organismes occupent le milieu réactionnel en formant des colonies ou biofilms à la surface des particules (Molz *et al.*, 1986). La première étape commune à toute action microbiologique est une phase d'hydrolyse au cours de laquelle les molécules organiques complexes sont, sous l'action d'enzymes, transformées en molécules solubles de plus petite taille, substrat indispensable aux réactions biologiques qui suivent. La suite de la chaîne réactionnelle dépend de la nature des accepteurs d'électrons présents dans le milieu et surtout de la présence ou non d'oxygène qui déterminera le type de processus à venir : la voie aérobie ou la voie anaérobie.

### **I.5.2.2. La biodégradation aérobie**

Une grande diversité de micro-organismes préexistants dans les déchets (principalement des bactéries, actinomycètes et champignons) consomme l'oxygène gazeux pour minéraliser la matière organique en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O (Mustin, 1987). Comme peu de micro-organismes sont capables de minéraliser complètement la matière organique, les sous-produits organiques peuvent être consommés directement par d'autres micro-organismes ou subsister pour un temps plus ou moins long dans la matrice déchet (Bardos, 2004). C'est cette voie métabolique qui est privilégiée lors du compostage. Elle est caractérisée par son exothermicité (2830 KJ pour une mole de glucose minéralisée (Gourdon, 2002). Ce dégagement de chaleur entraîne des modifications thermiques importantes du milieu nécessitant l'adaptation de la flore microbienne.

### **I.5.2.3. La biodégradation anaérobie**

La biodégradation anaérobie fait référence à un enchaînement d'étapes métaboliques souvent simultanées où les sous-produits d'une étape deviennent les substrats de l'étape suivante. Les produits de cette chaîne de réaction sont majoritairement le dioxyde de



carbone (CO<sub>2</sub>) et le méthane (CH<sub>4</sub>), dont le mélange est communément appelé biogaz. Les trois étapes de la dégradation anaérobie de la matière organique ont été abondamment décrites dans la littérature (Aragno, 1988; Christensen *et al.*, 1989) :

1. La fermentation acide ou l'acidogénèse des molécules hydrolysées en acides gras volatils (AGV), alcools, hydrogène et dioxyde de carbone par des bactéries fermentatives.

2. L'acétogénèse, où les bactéries acétogènes transforment les acides organiques de 3 à 6 atomes de carbone et les alcools en l'AGV le plus simple : l'acide acétique, en hydrogène et en dioxyde de carbone.

3. La méthanogène qui est l'étape finale conduisant à la production de méthane et de dioxyde de carbone soit à partir de l'acide acétique par les méthanogènes acétoclastes, soit par la voie hydrogénophile où les bactéries convertissent l'hydrogène et le dioxyde de carbone en méthane.

Les bactéries acidogènes sont anaérobies facultatives, c'est-à-dire qu'elles vont prioritairement consommer l'oxygène présent mais peuvent vivre en conditions anaérobies, alors que les acétogènes et les méthanogènes sont anaérobies strictes.

La chaîne de réaction de méthanisation qui transforme la matière organique en méthane et en dioxyde de carbone est faiblement exothermique par rapport à la réaction aérobie (401 kJ pour une mole de glucose convertie en 3 moles de CH<sub>4</sub> et trois moles de CO<sub>2</sub> (Gourdon, 2002)). Selon (Hartz *et al.*, 1982), la température optimale de dégradation anaérobie pour les ordures ménagères est comprise entre 35 et 41°C. La méthanogénèse et plus généralement la croissance anaérobie sont ralenties à une température inférieure à 20°C (Gourdon, 2002).

### **I.5.3. Description de la cinétique de croissance microbienne**

Depuis la première description de Buchanan (1918), il est classique de distinguer plusieurs phases dans la croissance des cultures bactériennes. Ces phases sont caractérisées par certaines valeurs ou variations de la vitesse de multiplication de la culture. On reconnaît classiquement les sept phases successives suivantes :

1. La phase de latence correspond à une phase d'adaptation des cellules à un nouvel environnement permettant la croissance. Cette phase de latence est une phase d'ajustement pendant laquelle les bactéries procèdent à des modifications dans le but de pouvoir initier la phase de croissance exponentielle (Buchanan et Klawitter, 1991). Sur la Figure 1 est

représentée la phase de latence pour une population de cellules inoculées dans un nouvel environnement. Au niveau des cellules individuelles la latence est associée à l'élongation des cellules au cours du cycle cellulaire (Kutalik et al., 2005). Le cycle cellulaire bactérien est divisé en trois phases. Au cours de la première phase, la cellule accroît sa masse jusqu'à ce qu'elle atteigne un niveau lui permettant l'initiation de la synthèse d'ADN.

La période de réplication totale de l'ADN bactérien depuis l'origine de réplication est la deuxième phase. La troisième et dernière phase du cycle bactérien, représente le temps nécessaire à la division de la cellule en deux cellules distinctes. Cette période regroupe la séparation des deux chromosomes, la synthèse des protéines de complétion, la formation d'un septum et la séparation des deux cellules. La croissance de la masse cellulaire est exponentielle tout au long du cycle (Donachie, 1968). Cependant le démarrage de la croissance exponentielle de la masse dès le début de la première phase est fonction de l'histoire des cellules. En effet, une cellule bactérienne peut présenter une latence avant la croissance exponentielle de sa masse (Kutalik et al., 2005). La première phase joue donc un rôle primordial sur la durée de la période du cycle cellulaire complet (Koppes et al., 1980 ; Kutalik et al., 2005) et ainsi sur la latence individuelle.

2. La phase d'augmentation de la vitesse de croissance qui passe plus ou moins rapidement de zéro à sa valeur maximale.

3. Les cellules en phase de croissance exponentielle constituent un autre état physiologique particulier des cellules bactériennes. Au niveau d'une population de cellules, la croissance se traduit par une augmentation exponentielle du nombre de cellule au cours du temps. Une mesure de la vitesse de croissance est le taux de croissance spécifique,  $\mu_{\max}$ . Au niveau d'une cellule bactérienne, la phase exponentielle de croissance se traduit par une croissance continue en longueur et en masse de la bactérie (Dens *et al.*, 2005).

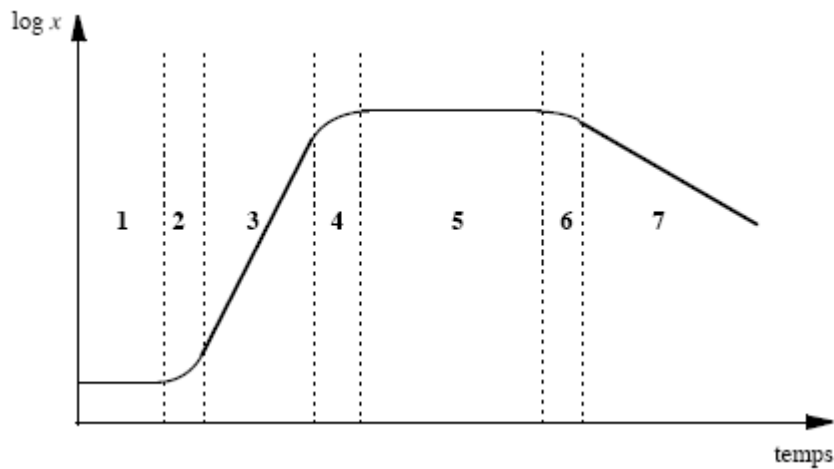
4. La phase de diminution de la vitesse de croissance qui progressivement devient nulle.

5. La phase stationnaire maximale ou plus simplement phase stationnaire qui correspond à un arrêt de la croissance, la culture atteint alors sa densité maximale. Le ralentissement puis l'arrêt de la croissance sont dus à l'épuisement d'une substance nutritive ou à toutes autres modifications des propriétés du milieu de culture le rendant impropre à la croissance des micro-organismes.

6. La phase de début de décroissance.

## 7. La phase de décroissance.

La cinétique de croissance des cultures bactériennes est donc essentiellement composée d'une phase de latence suivie d'une phase exponentielle puis d'une phase stationnaire. Les microbiologistes utilisent classiquement les paramètres suivants pour caractériser ces différentes phases : la densité cellulaire initiale ( $X_0$ ), le temps de latence ( $t_{lag}$ ), la vitesse de multiplication maximale ( $\mu_{max}$ ) ou le temps de génération ( $t_g$ ) et la densité maximale atteinte ( $X_{max}$ ).



**Figure 1.** Courbe de croissance d'une culture bactérienne et ses différentes phases (Buchanan, 1918).  $x$  représente la densité ou la biomasse de la culture. Les phases sont : (1) phase stationnaire initiale ou de latence, (2) phase d'accélération de la croissance, (3) phase de croissance à vitesse constante, (4) phase de ralentissement de la croissance, (5) phase stationnaire maximale, (6) et (7) phases de décroissance.

Le temps de latence,  $t_{lag}$ , est défini par convention comme étant l'intersection de la droite correspondant à la phase exponentielle (en coordonnées semi-logarithmiques) avec la droite horizontale passant par la concentration initiale,  $X_0$ . La vitesse de multiplication ou taux de croissance (vitesse de croissance par unité de densité) maximum,  $\mu_{max}$ , est la pente correspondant à la phase exponentielle (en coordonnées semi-logarithmiques).

### I.5.4. Quelques rappels sur le monde microbien

Les micro-organismes sont omniprésents dans notre environnement : eau, sol, air, plantes, animaux, humains. L'intérêt du point de vue de l'hygiène industrielle porte principalement sur les bioaérosols ou micro-organismes dans l'air, et plus spécifiquement sur les bactéries, les moisissures et levures et leurs métabolites, toxines ou fragments.

D'autres micro-organismes, associés occasionnellement à la qualité de l'air, il s'agit des mites de poussières ou acariens et des virus. La majorité des bioaérosols sont de dimension respirable, soit de l'ordre de 0,003 Fm pour les virus, de 0,5 à 20 Fm pour les bactéries, de 10 à 100 Fm pour les pollens de plantes et de 2 à 200 Fm pour les moisissures. Les effets sur la santé rapportés ici sont de nature globale et générale, cet aspect de la démarche devant toujours être confié à un médecin.

#### **I.5.4.1. Les bactéries**

Les bactéries sont abondantes dans l'environnement et chez les humains. On en connaît plus de 150 000 espèces. Ce sont des organismes unicellulaires qui se reproduisent par simple division cellulaire. La majorité des bactéries contiennent l'information génétique et la capacité énergétique nécessaires pour assurer leur croissance et leur reproduction. Elles sont aptes à utiliser diverses sources nutritives, inorganiques et organiques. La majorité des espèces rencontrées en qualité de l'air sont saprophytes, c'est-à-dire qu'elles tirent leur énergie de sources organiques.

La classification des bactéries est basée sur des caractéristiques cellulaires, morphologiques ou biochimiques. Elles se répartissent dans deux grands groupes, selon leur réaction à la coloration de Gram : bactéries Gram positives et bactéries Gram négatives. Les bactéries ont besoin de beaucoup d'humidité pour se multiplier. Les bactéries Gram négatives ont une paroi cellulaire fragile qui supporte mal la déshydratation subie pendant un passage prolongé dans l'air ou lors de l'échantillonnage. Les bactéries Gram positives ont une paroi plus résistante et certaines produisent des spores qui leur confèrent une résistance accrue aux variations des conditions environnementales. Dans ce groupe se trouvent les bactéries thermophiles, dont la croissance est favorisée par des températures plus élevées, et qui sont d'un intérêt particulier en qualité de l'air.

A l'extérieur, les bactéries proviennent majoritairement de l'eau, du sol et des plantes et elles sont associées à la présence d'humains et d'animaux.

Des étendues d'eau peuvent en dissiper dans l'air par aérosolisation, tout comme le font les émissions de certains procédés industriels et celles des unités de refroidissement.

A l'intérieur des édifices non industriels, les bactéries proviennent principalement des occupants puisqu'elles constituent la flore naturelle de la peau et des muqueuses.

Leurs espèces y sont plus nombreuses et leurs concentrations, supérieures à celles de l'environnement extérieur. Certains milieux de travail, tels que les granges, les fermes d'élevage, les centres de traitement des déchets et des eaux usées, les usines d'aliments et de boissons, sont quant à eux propices à la présence et à la croissance bactérienne.

C'est dans les environnements de ce type que les bactéries Gram négatives sont le plus susceptibles d'être mesurées.

La majorité des bactéries présentes naturellement ne causent pas d'effets néfastes à la santé. Certaines sont même essentielles autant à l'organisme humain qu'à l'environnement.

Les risques pour la santé apparaissent lorsque les concentrations de certaines espèces deviennent anormalement élevées. Ainsi, de fortes concentrations de bactéries thermoactinomycètes peuvent causer une pneumonite d'hypersensitivité, telle que la maladie du poumon du fermier.

Certaines bactéries sont reconnues comme étant des agents responsables de maladies infectieuses. Le risque pour la santé relié à la présence de la bactérie *Legionella pneumophila*, soit la légionellose, est bien documenté. Il existe deux formes distinctes de légionellose : la maladie du légionnaire, une pneumonie progressive pouvant être mortelle, et la fièvre de Pontiac, qui cause des symptômes similaires à ceux de la grippe. Cette bactérie est connue pour sa capacité à se développer dans des réservoirs d'eau. Elle est sujette au dessèchement et ne survit pas à l'extérieur de l'eau. Elle peut cependant être transmise dans l'air par la projection des gouttelettes d'eau qui en contiennent.

#### **I.5.4.2. Les moisissures et levures**

On compte actuellement plusieurs dizaines de milliers d'espèces connues de moisissures et de levures, les deux groupes appartenant à la famille des champignons. Omniprésents dans l'environnement, les champignons sont des saprophytes primaires, c'est-à-dire qu'ils utilisent la matière organique morte comme source nutritive pour leur croissance et leur reproduction. Plusieurs vivent dans les sols et prennent une part active dans la décomposition de la matière organique. Ils sont habituellement aérobies.

Les humains seraient exposés couramment à plus de 200 espèces d'entre eux, dont plusieurs prolifèrent bien dans un environnement intérieur humide.

Les levures sont des organismes unicellulaires qui se divisent par fission et par bourgeonnement. Les moisissures sont des organismes pluricellulaires qui se propagent par

leurs spores. Ces éléments se développent en filaments appelés hyphes, lesquels, en s'agglomérant, forment le mycélium. Celui-ci donne naissance à des structures plus spécialisées, les appareils sporifères, responsables de la formation des spores. Les spores diffèrent en formes, en dimensions et en couleurs. Elles peuvent survivre de quelques jours à quelques années. Chaque spore qui germe peut donner lieu à la croissance d'une nouvelle moisissure, laquelle peut, à son tour, produire des millions de spores dans des conditions de croissance appropriées.

Les moisissures libèrent leurs spores sous l'effet des mouvements d'air importants ou en réaction à des conditions défavorables, telles que l'augmentation ou la diminution rapide de l'humidité ou encore, en réponse au besoin d'atteindre une nouvelle source de nourriture. La présence de ces spores dans l'air dépend également de leur façon de se disperser. En fait, le mode de dispersion et de transfert des spores diffère selon les espèces. Certaines, appelées gloeiospores, ont une paroi épaisse, de consistance humide, et restent collées entre elles par un mucus. Elles forment des amas lourds difficilement transportables par l'air. Elles sont véhiculées au niveau des substrats par contact, par des insectes ou par l'eau. C'est le cas des moisissures du genre *Acremonium* et *Exophiala*. D'autres genres, tels que *Penicillium* et *Cladosporium* ont des spores à paroi sèche, facilement dissociables et légères. Elles sont ainsi plus facilement dispersées dans l'air.

Les concentrations de spores dans l'air étant dépendantes des conditions environnantes, elles varient donc au cours d'une même journée.

Dans la nature, la concentration des moisissures atteint son pic de juillet à la fin de l'automne. Contrairement aux pollens, les moisissures persistent malgré le premier gel. Quelques-unes peuvent se développer à des températures inférieures au point de congélation, mais la plupart tombent alors en dormance.

Le couvert de neige diminue de façon draconienne les concentrations dans l'air mais ne tue pas les moisissures. À la fonte des neiges, celles-ci se développent sur la végétation morte. La température influence leur taux de croissance.

Les moisissures ont une température de croissance minimale, maximale et optimale. La température ambiante de l'ordre de 20 à 25 °C maintenue dans la majorité des environnements intérieurs correspond à une zone idéale de croissance pour la majorité d'entre elles.

Les levures et les moisissures peuvent se trouver partout où il y a une température adéquate, de l'humidité, de l'oxygène, une source de carbone, d'azote et les minéraux dont elles ont besoin. Leurs activités de biodégradation ou de biodétérioration dépendent de leurs activités enzymatiques propres, des conditions environnementales, du phénomène de la concurrence et de la nature du substrat. Par exemple, certaines moisissures utilisent facilement la cellulose et leur prolifération est favorisée lorsque les matériaux qui en contiennent sont imbibés d'eau.

#### **I.5.4.3. Métabolites, toxines ou fragments de micro-organismes**

##### **Les mycotoxines**

Pendant le processus de dégradation de la matière nutritive, les moisissures libèrent des métabolites secondaires, appelés mycotoxines, qui leur servent de défense contre les autres micro-organismes, incluant les autres moisissures. Une même espèce fongique peut produire différentes toxines, selon le substrat et les facteurs environnementaux locaux. Les mycotoxines sont des composés non volatils qui se retrouveront dans l'air uniquement en cas d'agitation du milieu où elles sont produites.

Les effets sur la santé résultant d'une exposition respiratoire aux mycotoxines ne sont pas bien connus. Celles-ci pourraient être les agents causaux des effets rapportés suivant une exposition aux moisissures. Les symptômes décrits varient selon le type, la nature et l'ampleur du contact. Ils incluent l'irritation cutanée et celle des muqueuses, l'immunosuppression et des effets systémiques tels que étourdissements, nausées, maux de tête, effets cognitifs et neuropsychologiques. Notons que ces derniers effets sont peu documentés et que le mécanisme causal potentiel n'est pas élucidé. Certaines mycotoxines, dont l'aflatoxine, sont considérées cancérigènes ; l'ingestion de l'aflatoxine est une cause reconnue du cancer hépatique. La seule association entre le cancer et l'inhalation des mycotoxines a été démontrée dans des environnements agricoles ou industriels très contaminés.

##### **Les endotoxines**

Les endotoxines sont des constituantes de la membrane cellulaire extérieure des bactéries Gram négatives. Elles se composent de lipopolysaccharides associés à des

protéines et à des lipides. Le terme « endotoxine » fait référence à la toxine présente soit dans la cellule bactérienne, soit dans les fragments des parois cellulaires libérés pendant la lyse bactérienne. Leur présence dans un environnement de travail est en lien avec celle des bactéries Gram négatives.

Les effets sur la santé varient beaucoup selon les espèces, les individus, la dose et la voie d'entrée. Les symptômes rapportés suivant une exposition respiratoire aux endotoxines sont la toux, le souffle court, la fièvre, l'obstruction et l'inflammation des poumons ainsi que des problèmes gastro-intestinaux.

### **Glucan et ergostérol**

Le -(1-3)-D-glucan est un polymère de glucose à haut poids moléculaire qui se trouve dans les parois cellulaires des moisissures, des bactéries et des plantes. Des évidences récentes suggèrent qu'il serait un agent irritant pour les voies respiratoires. L'ergostérol est une composante de la membrane cellulaire des moisissures dont la proportion en masse serait à peu près constant. Les glucans et l'ergostérol pourraient agir comme des marqueurs environnementaux potentiels d'une exposition aux moisissures, mais leur signification quantitative est encore inconnue.

### **Autres**

Les peptidoglycans sont des composantes de la paroi cellulaire des bactéries. Ils sont soupçonnés d'être un agent causal potentiel de l'inflammation pulmonaire associée à l'inhalation des bactéries Gram positives.

Les exotoxines sont des molécules bioactives, habituellement des protéines sécrétées pendant la croissance des bactéries. Elles sont aussi libérées pendant la lyse des bactéries. Bien que généralement associées avec des maladies infectieuses, telles que le botulisme, le choléra et le tétanos, elles peuvent se retrouver sur des substrats qui supportent la croissance bactérienne et prendre subséquemment la forme d'un aérosol. Les risques associés à leur présence dans l'air ne sont pas documentés.

#### **I.5.4.4. Conditions de croissance**

La croissance d'un micro-organisme peut être considérée comme une série d'interactions entre les cellules et l'environnement. En plus de l'apport d'éléments



nutritifs, le milieu crée autour des cellules un environnement plus ou moins favorable en fonction de son humidité, de sa température, de son pH ou par la présence de substances antimicrobiennes.

#### **I.5.4. 4.1. Les besoins nutritionnels**

- Les macromolécules nutritives sont nécessaires dans des concentrations plus grandes que  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. Le carbone, l'azote, l'oxygène, l'hydrogène, le soufre, le phosphore, Mg<sup>2+</sup> et K<sup>+</sup>, sont des macromolécules nutritives majeures.

- Les micromolécules nutritives sont nécessaires dans les concentrations de moins que  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. Les éléments en traces comme Mo<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>2+</sup>, des vitamines, des hormones de croissance et des précurseurs métaboliques sont des micromolécules nutritives.

##### **I.5.4. 4.1.1. Les macromolécules nutritives**

Des composés carboniques sont les sources majeures de carbone cellulaire et d'énergie. Les micro-organismes sont classifiés dans deux catégories sur la base de leur source carbonique :

1. Hétérotrophes utilisent des composés organiques comme des glucides, des lipides et des hydrocarbures comme le carbone et une source d'énergie.

2. Autotrophes utilisent le dioxyde de carbone comme une source carbonique.

Les micro-organismes mixotrophes grandissent simultanément tant sous des conditions hétérotrophiques qu'autotrophiques; cependant, chez les micro-organismes autotrophiques, la croissance est stimulée par certains composés organiques. Les micro-organismes autotrophes facultatifs grandissent normalement dans des conditions d'autotrophie; cependant, ils peuvent grandir dans des conditions d'hétérotrophie en absence de CO<sub>2</sub>.

Les micro-organismes chimioautotrophes utilisent le CO<sub>2</sub> comme une source carbonique et obtiennent l'énergie de l'oxydation de composés inorganiques.

Les micro-organismes photoautotrophes utilisent le CO<sub>2</sub> comme une source carbonique et utilise la lumière comme une source d'énergie.

Les sources carboniques les plus communes dans des fermentations industrielles sont la mélasse (la saccharose), l'amidon (le glucose, le dextrine) et le sirop de maïs. Dans des

fermentations de laboratoire, le glucose, la saccharose et le fructose sont les sources carboniques les plus communes. Le méthanol, l'éthanol et le méthane constituent aussi des sources carboniques bon marché dans certaines fermentations. Dans la fermentation aérobie, environ 50 % de carbone de substrat sont incorporés dans des cellules et environ 50 % de cela sont utilisés comme une source d'énergie. Dans la fermentation anaérobie, une grande fraction de carbone de substrat est convertie en produits et une fraction plus petite est convertie en masse cellulaire (moins de 30 %).

**L'azote** constitue environ 10 % à 14 % de poids sec cellulaire. Les sources d'azote le plus largement utilisées sont l'ammoniac ou les sels d'ammonium [ $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ], des protéines, des peptides et des acides aminés. Quelques organismes comme *Azotobacter* et les cyanobactéries fixent l'azote de l'atmosphère à de l'ammonium. L'urée peut aussi être utilisée comme une source d'azote par quelques organismes. Des sources d'azote organiques comme l'extrait de levure et les peptones sont chères comparées aux sels d'ammonium. Quelques sources de carbone et d'azote utilisées par l'industrie de fermentation sont repri dans le tableau 4.

**L'oxygène** est présent dans tous les composants cellulaires organiques et l'eau cellulaire et constitue environ 20 % du poids sec des cellules. L'oxygène moléculaire est exigé comme un accepteur électronique terminal dans le métabolisme aérobie des composés carboniques. L'oxygène gazeux est présent dans le milieu de croissance en épargnant l'air ou par l'aération superficielle.

**L'hydrogène** constitue environ 8 % du poids sec cellulaire et est tiré principalement de composés carboniques, comme des glucides. Quelques bactéries (ex : méthanogènes) peuvent utiliser l'hydrogène comme une source d'énergie.

**Tableau 4.** Quelques sources de carbone et d'azote utilisées par l'industrie de fermentation

| <b>Sources carboniques</b>                | <b>Sources d'azote</b>      |
|---|-----------------------------|
| Déchets d'amidon (maïs et pomme de terre) | Repas de soja               |
| Mélasse (canne et betterave)              | Extrait de levure           |
| Petit-lait                                | Distillateurs solubles      |
| n-alkanes                                 | Extrait de graine de coton  |
| Gas-oil                                   | Sang Séché                  |
| Sulfite gaspillent le spiritueux          | Spiritueux raide de maïs    |
| Vidanges domestiques (intérieurs)         | Pêchez solubles et le repas |
| Déchets de cellulose                      | Repas d'arachide            |
| Carob haricot                             |                             |

**Le phosphore** constitue environ 3 % du poids sec cellulaire il est présent dans des acides nucléiques et dans la paroi cellulaire de quelques bactéries. Des sels de phosphate inorganiques, comme  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , sont les sels de phosphate les plus communs. Les glycérophosphates peuvent aussi être utilisés comme des sources de phosphate organiques. Le phosphore est un élément clef dans le règlement de métabolisme cellulaire. Le niveau de phosphate dans le milieu devrait être inférieur à 1 mM pour la formation de beaucoup de métabolites secondaires comme des antibiotiques.

**Le soufre** constitue presque 1 % du poids sec cellulaire et est présent dans des protéines et certains coenzymes. Les sels de sulfate comme  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sont la source de soufre la plus commune. Des acides aminés contenant le soufre peuvent aussi être utilisés comme une source de soufre. Certain autotrophes utilisent  $\text{S}^{2-}$  et  $\text{S}^0$  comme des sources d'énergie.

**Le potassium** est un cofacteur pour quelques enzymes et est exigé dans le métabolisme des glucides. Les cellules ont tendance à activement prendre  $\text{K}^+$  et  $\text{Mg}^{2+}$  et exclure  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ . Les sels de potassium le plus généralement utilisés sont  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et  $\text{K}_3\text{PO}_4$

**Le magnésium** est un cofacteur pour quelques enzymes et est présent dans des parois cellulaires et des membranes. Les ribosomes exigent spécifiquement des ions  $\text{Mg}^{2+}$ . Le magnésium est d'habitude fourni comme  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ou  $\text{MgCl}_2$ .

#### I.5.4. 4.1.2. Les microsubstances nutritives

Les éléments en traces sont essentiels pour la nutrition microbienne. Le manque d'éléments en trace essentiels augmente la phase de retard (le temps de l'inoculation à la reproduction cellulaire active dans la culture batch) et peut diminuer le taux de croissance spécifique et le rendement. Les trois catégories majeures de microsubstances nutritives sont discutées ci-dessous.

1. Les éléments en trace le plus largement utilisés sont : Fe, Zn et Mn. Le fer joue un rôle régulateur dans quelques processus de fermentation). Le zinc (Zn) est un cofacteur pour quelques. Le manganèse (Mn) est aussi un enzyme cofacteur et joue un rôle dans le règlement du métabolisme secondaire et l'excrétion de métabolites primaire.

2. Les éléments en trace nécessaires dans des conditions de croissance spécifiques sont : Cu, Co, Mo, Ca, Na, Cl, Ni et Se. Le cuivre (Cu) est présente dans des certains composants de la chaîne respiratoire et les enzymes. Certains micro-organismes méthanogènes exigent le cobalt. Le molybdène (Mo) est exigé pour la croissance sur  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{N}_2$  comme sources uniques d'azote. Le sodium (Na) est nécessaire en quantités infimes par quelques bactéries, particulièrement méthanogènes pour l'équilibre ionique. Les chlorures ( $\text{Cl}^-$ ) sont nécessaires par certaines halobactérie et des microbes marins, qui exigent  $\text{Na}^+$ . Le nickel (Ni) est exigé par certains micro-organismes méthanogènes comme cofacteur et le sélénium (Se) est exigé dans le métabolisme de quelques organismes.

3. Les éléments en trace qui sont rarement exigés sont B,  $\text{Al}^-$ , Si, Cr, V, Sn, Be, F, Ti, Ga, Ge, Br, Zr, W, Li et I. Ces éléments sont exigés dans les concentrations de moins que  $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  et sont toxique à de haute concentration, comme  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

Quelques ions comme  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  peuvent précipiter dans le milieu nutritif et devenir indisponibles aux cellules. Les chélateurs sont utilisés pour former des composés solubles avec les ions de précipitation.

Les polyphosphates, histidine, tyrosine et cystéine sont les agents chélateurs le plus généralement utilisés.  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  est l'agent chélateur le plus commun. EDTA peut enlever quelques composants d'ions métalliques de la paroi cellulaire, comme  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  et peut causer la désintégration de la paroi cellulaire. Les facteurs de croissance stimulent la croissance et la synthèse de certains métabolites. Les vitamines, des hormones et des acides aminés sont des facteurs de croissance majeurs. Les vitamines fonctionnent d'habitude comme coenzymes. Les vitamines sont exigées à une gamme de concentration

de  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> à  $10^{-12}$  mol L<sup>-1</sup>. Selon l'organisme, certains ou tous les acides aminés peuvent devoir être fournis extérieurement dans des concentrations de  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> à  $10^{-13}$  mol L<sup>-1</sup>.

Quelques acides gras, comme l'acide oléique et stérols, sont aussi nécessaires dans de petites quantités par quelques organismes (Michael L. Shuler et Fikert Kargi, 1992).

#### **I.5.4. 4.2. Influence de l'environnement**

Les nutriments constitutifs et énergétiques nécessaires aux micro-organismes doivent être apportés dans des conditions d'environnement favorables. En effet, plusieurs facteurs de l'environnement peuvent influencer la croissance des micro-organismes tel que la température, le pH, l'oxygène, et l'activité de l'eau.

La température optimale de croissance des micro-organismes se situe entre 25 et 30°C (BeliN, 1988). Alors que l'optimum de pH pour la croissance des micro-organismes varie de 4,5 à 6,5, beaucoup d'espèces tolèrent de grandes variations de pH: il est de 3,6 pour *S. cerevisiae* (Yarrow, 1984). D'autre part, toutes les micro-organismes sont capables de se développer en présence d'oxygène: il n'y a pas de micro-organismes anaérobies stricts. Cependant, certains micro-organismes sont aérobies stricts. En ce qui concerne les micro-organismes aéro-anaérobies facultatifs, certains préfèrent un métabolisme fermentaire même en présence d'oxygène. Les saccharomyces et d'autres préfèrent un métabolisme respiratoire (*Candida*) (Ribéreau *et al.*, 2000). A signaler aussi que la plupart des micro-organismes ne peuvent pas se développer pour des activités de l'eau inférieures à 0,90 (Leveau et Bouix, 1993).

### **I.6. Informations générales sur la méthyl éthyl cétone**

#### **I.6.1. Principaux synonymes**

| <b>Noms français</b>    | <b>Noms anglais</b>       |
|-------------------------|---------------------------|
| Méthyl éthyl cétone     | Methyl ethyl ketone (MEK) |
| Méthyléthylcétone (MEC) | Ethyl methyl ketone       |
| Butanone-2              |                           |

(Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. (1991-1998))

### **I.6.2. Utilisation et sources d'émission**

La MEK est surtout utilisée comme solvant. Son pouvoir de dissolution lui permet de dissoudre des gommes, des résines, plusieurs polymères synthétiques, des graisses et des huiles. Ainsi, on l'utilise dans diverses formulations dont :

- des revêtements de polymères vinyliques
- des laques, notamment les laques à base de nitrocellulose et des acryliques
- des vernis et peintures à vaporiser
- des décapants et diluants à peintures et vernis
- des encres d'imprimeries
- des colles et autres adhésifs

En industrie, on utilise la MEK dans de nombreux procédés tels que :

- le dégraissage du métal
- l'extraction de graisses, huiles, cires et résines naturelles
- le déparaffinage des huiles minérales
- la fabrication de cuir synthétique, de ruban magnétique, de film transparent et autres polymères
- la fabrication des poudres colloïdales en pyrotechnie
- la décaféination du café et du thé
- l'extraction de saveurs.

La MEK est aussi un intermédiaire de synthèse de plusieurs produits chimiques de différentes catégories dont :

- la méthyl isopropyl cétone
- le peroxyde de méthyl éthyl cétone, un catalyseur de polymérisation
- la méthyl éthyl cétoxime, un antioxydant utilisé par exemple, dans les peintures
- Le diacétyle.

D'autre part, l'activité humaine peut être source d'émission de méthyl éthyl cétone dans l'atmosphère, dont entre autres, les gaz d'échappement des véhicules et la fumée de cigarette. L'activité bactérienne, certaines plantes et quelques aliments seraient des sources naturelles à faible teneur (International Programme on Chemical Safety, 1992 ; Bohnet *et al.*, 2003)

### I.6.3. Propriétés physiques du MEK

**Tableau. 5** propriétés physique du MEK (Vincoli, 1997 ; Bohnet, 2003)

| État physique              | Liquide                                |
|----------------------------|--|
| Masse moléculaire          | 72,11                                  |
| Densité                    | 0,806 g/ml à 20 °C 0,7999 g/ml à 25 °C |
| Solubilité dans l'eau      | 275 g/l à 20 °C                        |
| Densité de vapeur (air=1)  | 2,49                                   |
| Concentration à saturation | 93000 ppm                              |
| Point de fusion            | -86,6 °C                               |
| Point d'ébullition         | 79,6 °C                                |

### I.6.4. Toxicocinétique

La méthyléthylcétone (MEK) est rapidement absorbée par inhalation. Le taux de rétention pulmonaire se situe entre 41 et 53 % chez des volontaires exposés à 200 ppm pendant 4 heures. La quantité absorbée est proportionnelle à la concentration inhalée, à la durée de l'exposition et au taux de ventilation alvéolaire. L'exercice physique augmente l'absorption de la MEK. L'absorption cutanée de la MEK est rapide puisqu'on la retrouve dans l'air expiré 2,5 à 3 minutes après son application sur une peau normale au niveau de l'avant bras. La concentration de la MEK dans l'air expiré atteint un plateau en 2 à 3 heures.

Une étude montre que l'absorption est plus lente et moins importante sur une peau sèche ou normale que sur une peau humide. Lorsque la peau est humide, l'absorption est très rapide. En effet, la MEK est détectée dans l'air expiré moins de 30 secondes après son application sur l'avant-bras. La concentration maximale de la MEK dans l'air expiré, qui est atteinte en 10 à 15 minutes, est environ 4 fois supérieure à celle que l'on observe sur une peau normale ou sèche. L'absorption des vapeurs par la peau n'a pas été étudiée.

La MEK est absorbée par les voies digestives puisqu'elle a été mesurée dans le sang de personnes en ayant ingéré.

Des études de toxicité aiguë (DL50) nous indiquent que le produit est absorbé par les voies digestives.

On pense que la majorité de la MEK absorbée chez l'humain est métabolisée en butanediol-2,3 lequel entre par la suite dans le cycle métabolique général et est éliminé sous forme de molécules simples comme le dioxyde de carbone et l'eau. Cependant, les voies métaboliques n'ont pas été complètement élucidées.

Chez l'humain, suite à une exposition par inhalation, les deux métabolites retrouvés en faibles concentrations dans l'urine sont l'hydroxy-3 butanone-2 (0,1 %) et le butanediol-2,3 (2 %).

De l'alcool butylique secondaire a été retrouvé dans le sang de volontaires exposés à 200 ppm du MEK pendant 4 heures.

A partir d'études chez plusieurs espèces animales, un schéma généralisé du métabolisme de la MEK a été observé. La MEK est métabolisée dans le foie où la majeure partie est oxydée en hydroxy-3 butanone-2 avant d'être réduite en butanediol-2,3 qui lui est transformé en dioxyde de carbone et en eau. Une petite partie de la MEK peut être réduite en alcool butylique secondaire qui sera à son tour rapidement oxydé pour redonner de la MEK.

Chez le rat, environ 35 % de la MEK administrée oralement est convertie en butanediol-2,3, 4 % en alcool butylique secondaire et 4 % en hydroxy-3 butanone-2.

De manière qualitative, le métabolisme est similaire chez l'humain et l'animal puisqu'ils ont les mêmes métabolites.

L'élimination san

guine de la MEK chez l'humain est bi-phasique, comportant une phase rapide et une phase lente. La demi-vie est de 30 minutes pour la phase rapide et d'environ 81 minutes pour la phase lente.

La demi-vie d'élimination dans l'urine est de 4 heures.(Dowty et al., 1976 ; Dietz et al., 1981 ;Bates, 2002 ;Liira et al., 1988)



### **II.1. Origine du consortium**

Le consortium utilisé pour l'inoculation provient d'une culture mixte de micro-organismes prélevée dans les bassins d'aération de la station d'épuration biologique d'El Menia Constantine.

### **II.2. Description du réacteur batch**

Des bouteilles en verre scellées d'un volume total de 1,045 litres, ont servi de réacteurs batch le bouchon muni d'un orifice protégé afin d'éviter tout échange gazeuses avec le milieu extérieur, permet les prélèvements aqueux, prévus pour le suivi de la croissance des micro-organismes et la dégradation du substrat.

### **II.3. Milieu nutritif**

Un premier essai de mise en culture des micro-organismes en présence du MEK/acétone a été lancé avec un milieu nutritif dont la composition est repri au tableau 6 (Deseveaux, 1995). Ce milieu liquide constitué de macroéléments et de micro-éléments apporte aux micro-organismes tous les éléments nécessaires au développement cellulaire, à part la source de carbone représentée par la MEK ou par l'acétone ou par les deux.

Le pH du milieu est compris entre 6 et 7, elle est du aux ions  $\text{NH}_4^+$  produits par l'unique source d'azote qu'est le sulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

**Tableau 6.** Composition du milieu nutritif (Deseveaux. 1995)

| Milieu nutritif                |  | Concentrations          |
|--------------------------------|--|-------------------------|
| <b>Tampon et macroéléments</b> | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>      | 3,00 g L <sup>-1</sup>  |
|                                | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 1,09 g L <sup>-1</sup>  |
|                                | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O | 3,49 g L <sup>-1</sup>  |
|                                | MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O                | 0,2 g L <sup>-1</sup>   |
| <b>Micro-éléments</b>          | EDTA   | 10 mg L <sup>-1</sup>   |
|                                | FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O                | 5 mg L <sup>-1</sup>    |
|                                | MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O                | 1,22 mg L <sup>-1</sup> |
|                                | ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O                | 0,25 mg L <sup>-1</sup> |
|                                | CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O                | 0,2 mg L <sup>-1</sup>  |
|                                | CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O                | 1 mg L <sup>-1</sup>    |
|                                | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O  | 0,2 mg L <sup>-1</sup>  |

#### II.4. Conditions opératoires de culture

Les caractéristiques de la croissance et de la dégradation du MEK sont étudiées pour des cultures mixtes en suspension, dans des réacteurs batch.

L'objectif de ces expériences est de mettre en évidence l'influence de la concentration initiale du MEK et de la concentration initiale de biomasse sur les paramètres cinétiques de biodégradation, ainsi que l'influence de la présence de second substrat.

La charge maximale du MEK biodégradable dans un réacteur a été calculé afin d'éviter la limitation par l'oxygène.

Cependant, il est évident qu'un minimum de phase liquide est nécessaire pour la croissance des micro-organismes, pour suivre la densité optique et la concentration au cours de l'expérience sans perturber la croissance. Nous avons cherché un compromis et fixé le volume de phase liquide à 90 ml.

La taille de l'inoculum est fixée à 20 % (v/v) de la phase liquide. La concentration de cet inoculum est ajustée de façon à avoir une concentration de départ dans les réacteurs de 0,125 g<sub>ps</sub> L<sup>-1</sup>.

Les réacteurs sont placés dans un bain-marie MEMMERT de type GFL 1083, avec agitation, à 35C<sup>0</sup>.

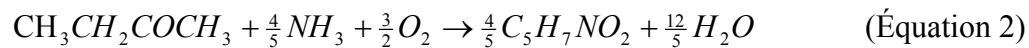
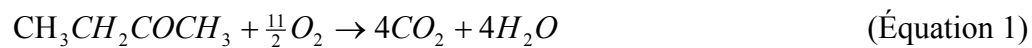
### II.5. Calcul de la charge maximal du MEK biodégradable dans un réacteur

L'oxygène est indispensable à notre consortium pour la dégradation et la transformation en biomasse de la MEK et de l'acétone. Sachant que l'oxygène est peu soluble et que nous voulons appliquer des charges élevées en MEK et en acétone aux réacteurs, nous devons donc réduire le volume de phase liquide au maximum pour que les micro-organismes trouvent l'oxygène nécessaire.

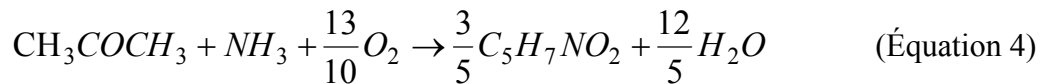
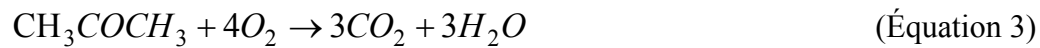
Il nous reste maintenant à calculer, connaissant la quantité d'oxygène en phase gazeuse via la loi des gaz parfaits, la quantité maximale des substrats qui peut être dégradée par les micro-organismes dans les réacteurs. Ceci nécessite de connaître la ou les équations stoechiométriques reliant l'oxygène et les substrats.

Nous avons supposé que les deux substrats (MEK et acétone) pourraient être transformés intégralement en biomasse et en  $CO_2$  par les voies métaboliques classiques suivant les deux équations suivantes :

Pour la MEK :



Et pour l'acétone :



Cette supposition semble être confirmée par des expériences préliminaires de croissance et de dégradation. En effet, lors de ces expériences où ont été suivies simultanément les concentrations en biomasse et en substrat au cours du temps, nous avons observé que la formation de biomasse et la dégradation des substrats étaient liées.

Les équations n° 1 et 2 et les équations n° 3 et 4 sont reliées par un rendement  $Y_{x/s}$  appelé rendement de conversion du substrat en biomasse.

### II.6. Obtention des micro-organismes pour constituer l'inoculum

Pour réduire, voire éliminer la phase de latence de nos expériences de cinétique, nous utilisons pour ensemercer nos réacteurs des cellules se trouvant en phase de pleine croissance. Des précultures sont réalisées à cet effet.

Pour standardiser ces précultures, nous avons défini les conditions opératoires suivantes :

- Notre réacteur batch contient 90 ml de phase liquide
- La densité de l'inoculum de départ est de  $0,125 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ L}^{-1}$
- La concentration appliquée est de 1000 ppm du MEK ou 500ppm de MEM plus 500ppm d'acétone lorsque le consortium est en présence d'un mélange des deux.

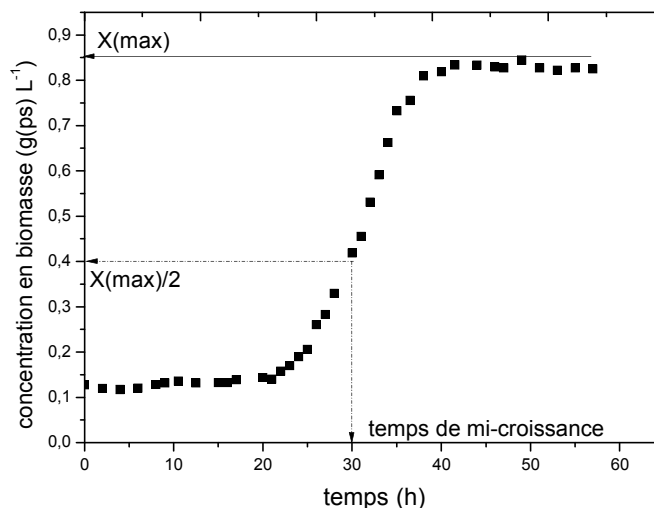
Dans ces conditions, le moment où les micro-organismes se trouvent à la moitié de leur croissance totale est repéré grâce à la mesure de densité optique. Nous désignons ce moment le point de "mi-croissance" (figure 2).

Après récolte des cellules au point de "mi-croissance", il faut procéder au lavage des cellules pour éliminer les substrats résiduels et les suspendre dans du milieu défini neuf.

Ceci se fait suivant la procédure : centrifugation (35000 rpm, 3 minutes, ROTO FIX), élimination du surnageant et resuspension dans du milieu défini. Cette opération est réalisée deux ou trois fois.

Nous pouvons analyser un échantillon grâce à un CPG (Shimadzu A17) pour vérifier l'absence de traces des substrats résiduelle.

Finalement, nous procédons à un ajustement de la concentration en biomasse afin d'obtenir un inoculum adapté à nos expériences, c'est-à-dire un inoculum à la concentration de  $0,625 \text{ g L}^{-1}$ , avant de diluer 5 fois dans du milieu défini.



**Figure 2.** Cinétiques de croissance de la MEK par le consortium bactérien en l'absence d'acclimatation pour éliminer la phase de latence (concentration initiale en MEK =  $20 \text{ mMol L}^{-1}$ ).

## II.7. Prélèvements

Les prélèvements horaires doivent se faire à partir de chaque réacteur batch. Ces prélèvements d'un volume de 2 ml sont répartis dans deux tubes.

- 1,5 ml du volume total permet la lecture de la densité optique (D.O)
- Le volume restant est mis dans un tube fermé, pour éviter les pertes de substrat, il subit alors une centrifugation à 35000 rpm pendant 3 mn afin d'obtenir un surnageant exempt des cellules microbiennes.

Les échantillons, conservés dans des flacons à 4 °C, sont prêts à la mesure de la concentration en substrat par chromatographie en phase gazeuse.

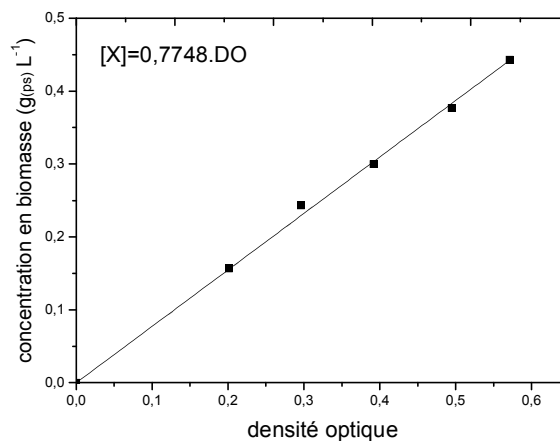
## II.8. Suivi de la croissance du consortium

Le suivi de la quantité de biomasse au cours du temps se fait par lecture directe de la densité optique sur le spectrophotomètre à 546nm.

Un étalonnage a été réalisé afin de convertir la densité optique en concentration en biomasse. Elle est exprimée en grammes de poids sec de cellules par litre (figure 3).

Le principe de l'étalonnage consiste en la préparation de suspensions homogènes à différentes concentrations à partir d'une culture de notre consortium arrivée en phase stationnaire de croissance et en la mesure du poids sec de ces étalons.

Pour réaliser cette dernière étape, les différentes suspensions de biomasse, dont la densité optique a été lue préalablement sur le spectrophotomètre, sont placées dans des creusets. Ensuite ils sont mis à l'étuve à 100 °C pendant 24 heures.



**Figure 3.** Courbe d'étalonnage reliant la concentration en biomasse X à la densité optique DO

### II.9. Suivre la consommation des substrats

Le suivi de la consommation des substrats au cours du temps se fait par chromatographie en phase gazeuse. Cette méthode chromatographique permet de séparer des mélanges gazeux complexes suite à un équilibre s'établissant entre une phase mobile gazeuse et une phase stationnaire appropriée. Cette méthode ne s'adresse pas seulement aux molécules se trouvant naturellement à l'état de gaz, mais à tout composé susceptible d'être volatilisé par l'élévation de la température. La nécessité de maintenir les molécules à l'état gazeux implique donc que toute l'opération d'analyse chromatographique se réalise à une température compatible avec cet état sans provoquer leur destruction. Un nombre de molécules peuvent ainsi être séparées directement ou après transformation lorsqu'elles sont thermolabiles ou peu volatiles.

Un volume de 1 µl d'échantillon est manuellement introduit avec une micro-seringue SGE de 10 µl dans un chromatographe SHIMADZU de type GC-17A opérant isothermiquement à 130 °C, combiné à une colonne capillaire de type DB-5 (0,25 mm D.I × 30m) et un détecteur FID. L'azote est utilisé comme gaz vecteur avec un débit entrant de 45 ml/mn. Un split ratio de 50 étant utilisé, il s'ensuit que le débit de l'azote traversant la colonne est de 0,9 ml/mn. Les températures atteintes par le détecteur et l'injecteur sont de 200 °C et de 250 °C respectivement.

L'utilisation d'un standard externe avec une concentration de 1000 ppm du MEK permet l'étalonnage de l'appareil. Dans le cas où on utilise un mélange du MEK et d'acétone, le standard externe est préparé avec 500 ppm du MEK et 500 ppm d'acétone.

Le temps de rétention de la MEK est en moyenne de 2,3 minutes. Celui de l'acétone est de 2,1 minutes.

On effectue trois mesures du substrat pour chaque échantillon. La reproductibilité et la fiabilité des résultats sont confirmées par le calcul du coefficient de variation (écart type / moyenne) qui ne doit pas dépasser 5 %.